

นัทธีวรรณ อุดมศิลป์ : เทคนิคทางอนุวิทยาสำหรับวิเคราะห์ก๊าล้าเชื้อเชิงปริมาณและการติดตาม
รูปแบบจุลินทรีย์และบทบาทในกระบวนการหมักน้ำปลา (MOLECULAR-BASED
TECHNIQUES FOR QUANTIFICATION OF STARTER CULTURES AND MONITORING
OF MICROBIAL PROFILES AND THEIR ROLES IN FISH SAUCE FERMENTATION)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล, 204 หน้า.

วิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจจับ
แบบจำเพาะเจาะจงและตรวจวัดปริมาณของ *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Tetragenococcus halophilus*
MS33 ซึ่งเป็นก๊าล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลา ดีเอ็นเอติดตาม (probe) Vir1086 และ Tet48 ออกแบบมา
จากยีน alkaline serine protease-X (*aprX*) และ internal transcribed spacer (ITS) ของ *Virgibacillus* sp.
SK37 และ *T. halophilus* MS33 ตามลำดับ แสดงความจำเพาะเจาะจงในระดับสปีชีส์ (species-specificity)
ต่อ *V. halodenitrificans* และ *T. halophilus* ตามลำดับ โดยไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของแบคทีเรียท้องถิ่น
ชนิดอื่นที่คัดแยกจากกระบวนการหมักน้ำปลา ประสิทธิภาพของดีเอ็นเอติดตาม Vir1086 และ Tet48
สำหรับตรวจจับดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 และ *T. halophilus* MS33 มีค่าเท่ากับ 100.4%
และ 91.7% ตามลำดับ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (quantification limits) สำหรับ *Virgibacillus* sp. SK37
และ *T. halophilus* MS33 คือ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร และ 10^2 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ วิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ
ร่วมกับโพรพิเดียมโมโนเอไซด์ (propidium monoazide, PMA) เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (PMA-qPCR)
สามารถตรวจจับการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Virgibacillus* sp. SK37 และ *T. halophilus*
MS33 ในแบบจำลองกระบวนการหมักน้ำปลาด้วยปลาแมคคาเรล (mackerel) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณของก๊าล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลาที่ระยะเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี
PMA-qPCR มีค่าสูงกว่าการตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10^{-10^3} เซลล์/มิลลิลิตร ในช่วง 120-150
วันของการหมัก ($P < 0.05$) ตัวอย่างที่เดิมก๊าล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นเวลา 1 เดือน ตามด้วย *T.*
halophilus MS33 (SK37_1M+MS33) พบการอยู่รอดของ *T. halophilus* MS33 สูงกว่าตัวอย่างที่ใช้ก๊าล้า
เชื้อเดี่ยว ตัวอย่าง SK37_1M+MS33 และก๊าล้าเชื้อเดี่ยว *Virgibacillus* sp. SK37 (SK37) มีปริมาณฮีสตามีน
ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($P < 0.05$) ปริมาณแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมก๊าล้าเชื้อพร้อมกัน
(MS33+SK37) และ SK37_1M+MS33 เท่ากับ 1,160.41 และ 1,185.71 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อ
เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (1,008.29 มิลลิโมลาร์) และมีปริมาณกรดกลูตามิกอิสระ (free glutamic)
และทั้งหมด (total glutamic) สูงกว่าตัวอย่างควบคุม ($P < 0.05$) 2-เมทิลโพรพาแนล (2-methylpropanal) 2-
เมทิลบิวทาแนล (2-methylbutanal) 3-เมทิลบิวทาแนล (3-methylbutanal) เป็นสารระเหยเด่นที่พบใน
ตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมก๊าล้าเชื้อ SK37_1M+MS33 ดังนั้นการเดิมก๊าล้าเชื้อตามลำดับในระหว่างกระบวนการ
หมักจึงมีศักยภาพในการปรับปรุงคุณภาพของสารระเหยและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลา

รูปแบบของแบคทีเรียในน้ำปลาที่เติมกล้ำเชื้อเมื่อวิเคราะห์ด้วย 16S rRNA gene sequencing โดย next generation sequencing, Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM[®]) พบว่า แบคทีเรียสกุลเด่น ได้แก่ *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*, *Tetragenococcus*, และ *Virgibacillus* การเติมกล้ำเชื้อร่วม พร้อมกัน MS33+SK37 ส่งผลให้พบ *Virgibacillus* เป็นแบคทีเรียสกุลเด่น แต่พบ *T. halophilus* คือ แบคทีเรียเด่นในตัวอย่างน้ำปลา SK37_1M+MS33



NATTEEWAN UDOMSIL : MOLECULAR-BASED TECHNIQUES FOR
QUANTIFICATION OF STARTER CULTURES AND MONITORING OF
MICROBIAL PROFILES AND THEIR ROLES IN FISH SAUCE
FERMENTATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT
YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 204 PP.

DNA PROBES/ QPCR/*TETRAGENOCOCCUS HALOPHILUS* MS33/ *VIRGIBACILLUS*
SP. SK37/COMBINED CULTURES/AMINO ACIDS/VOLATILE COMPOUNDS/FISH
SAUCE/BACTERIAL PROFILING

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) methods were developed for the specific detection and quantification of *Virgibacillus* sp. SK37 and *Tetragenococcus halophilus* MS33, which were used as starter cultures for fish sauce fermentation. Vir1086 and Tet48 probes were designed from the alkaline serine protease-X gene (*aprX*) and the internal transcribed spacer (ITS) of *Virgibacillus* sp. SK37 and *T. halophilus* MS33, respectively, showed species-specificity for *V. halodenitrificans* and *T. halophilus*, respectively, without cross reacting with other species of microbiota isolated from fish sauce fermentation. The efficiencies of Vir1086 and Tet48 probes for the detecting purified DNA from *Virgibacillus* sp. SK37 and *T. halophilus* MS33 were 100.4% and 91.7%, respectively. The quantification limits of the method for *Virgibacillus* sp. SK37 and *T. halophilus* MS33 detection were 10^3 Cells/mL and 10^2 Cells/mL, respectively. The qPCR combined with 100 μ M of propidium monoazide (PMA-qPCR) method was successfully detected viable cell changes of *Virgibacillus* sp. SK37 and *T. halophilus* MS33 in a Spanish mackerel fish sauce fermentation model.

Quantification of starter cultures in fish sauce fermented for 6 months by PMA-qPCR was higher than that of viable plate counts about 10 - 10^3 Cells/mL at 120-150 days of

fermentation ($P < 0.05$). Fish sauce prepared by adding *Virgibacillus* sp. SK37, followed by *T. halophilus* MS33 after one month (SK37_1M+MS33), showed higher survival rate of *T. halophilus* MS33 than that of the single starter culture treatment. Histamine contents of SK37_1M+MS33 and fish sauce inoculated with *Virgibacillus* sp. SK37 (SK37) were lower than the control ($P < 0.05$). α -Amino contents of fish sauce added simultaneous co-cultures (MS33+SK37) and SK37_1M+MS33 were 1,160.41 and 1,185.71 mM, respectively, compared to the control (1,008.29 mM). Contents of total and free glutamic acid from inoculated fish sauce were also higher than the control ($P < 0.05$). 2-Methylpropanal, 2-methylbutanal, and 3-methylbutanal were major volatile compounds found in SK37_1M+MS33 fermentation. Addition of starter culture, particularly co-cultures in sequential order (SK37_1M+MS33), showed potential to improve volatile compound and chemical compositions of fish sauce to a greater extent than single culture inoculation.

Bacterial profiling of fish sauce inoculated with starter cultures was analyzed by 16S rRNA gene sequencing using next generation sequencing, Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM[®]). Genera *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*, *Tetragenococcus*, and *Virgibacillus* were dominant. *Virgibacillus* was predominant in fish sauce inoculated with MS33+SK37 but *Tetragenococcus* was dominant in fish sauce inoculated with SK37_1M+MS33.

School of Food Technology

Academic Year 2014

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____